Health Canada Santé Canada

GUIDANCE FOR INDUSTRY

Genotoxicity: A Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals

ICH Topic S2B

Published by authority of the
Minister of Health

Date Adopted by the TPP	1999/12/16
Effective Date	2000/03/24

Therapeutic Products Programme
Guidance Document

Canada

Our mission is to help the people of Canada maintain and improve their health.

Health Canada

Our mission is to ensure that the drug, medical devices, and other therapeutic products available in Canada are safe, effective and of high quality and that narcotic and restricted substances are not abused or diverted from legitimate uses.

Therapeutic Products Programme

THERAPEUTIC PRODUCTS PROGRAMME WEBSITE
(TP-Web)

LET YOUR COMPUTER DO THE SEARCHING!

... Need to know how to market a new drug in Canada?

... Want information on the drug regulatory process?

... Need to know what the newest drugs on the Canadian market are?

... Want direct access to forms and policies?

... Need to know the requirements for labelling drugs?

All this and more is available on the

Therapeutic Products Programme Website
at
www.hc-sc.gc.ca/hpb-dgps/therapeut

© Minister of Public Works and Government Services Canada 2000

Available in Canada through
Health Canada - Publications
Brooke Claxton Building, A.L. #0913A
Tunney's Pasture
Ottawa, Ontario
K1A 0K9

Tel: (613) 954-5995
Fax: (613) 941-5366

Également disponible en français sous le titre : Génotoxicité : Batterie d'épreuves normalisées pour l'évaluation de la génotoxicité des produits pharmaceutiques

Catalogue No. H42-2/67-16-1999E
ISBN 0-662-28443-7

102-01595/

FOREWORD

This guidance has been developed by the appropriate ICH Expert Working Group and has been subject to consultation by the regulatory parties, in accordance with the ICH Process. The ICH Steering Committee has endorsed the final draft and recommended its adoption by the regulatory bodies of the European Union, Japan and USA.

In adopting this ICH guidance, the Therapeutic Products Programme (TPP) endorses the principles and practices described therein. This document should be read in conjunction with the accompanying covering letter and with the relevant sections of other applicable Programme guidances.

Guidance documents are meant to provide assistance to industry and health care professionals on **how** to comply with the TPP policies and governing statutes and regulations. They also serve to provide review and compliance guidance to TPP staff, thereby ensuring that the Programme's mandate is implemented in a fair, consistent and effective manner.

Guidance documents are administrative instruments not having force of law and, as such, allow for flexibility in approach. Alternate approaches to the principles and practices described in this document ***may be*** acceptable provided they are supported by adequate scientific justification. Alternate approaches should be discussed in advance with the Programme to avoid the possible finding that applicable statutory or regulatory requirements have not been met.

As a corollary to the above, it is equally important to note that the Programme reserves the right to request information or material, or define conditions not specifically described in this guidance, in order to allow the Programme to adequately assess the safety, efficacy or quality of a therapeutic product. The TPP is committed to ensuring that such requests are justifiable and that decisions are clearly documented.

TABLE OF CONTENTS

1. INTRODUCTION 1

2. GENERAL PURPOSE OF GENOTOXICITY TESTING 1

3. THE STANDARD TEST BATTERY FOR GENOTOXICITY 1

4. MODIFICATIONS OF THE 3-TEST BATTERY 3
   - 4.1 Limitations to the use of bacterial test organisms 3
   - 4.2 Compounds bearing structural alerts for genotoxic activity 3
   - 4.3 Limitations to the use of standard *in vivo* tests 4
   - 4.4 Additional genotoxicity testing in relation to the carcinogenicity bioassay 4
     - *4.4.1 Evidence for tumor response* 4
     - *4.4.2 Structurally unique chemical classes* 4

5. STANDARD PROCEDURES FOR *IN VITRO* TESTS 4

6. NOTES 6

7. GLOSSARY 9

1. INTRODUCTION

Two fundamental areas in which harmonisation of genotoxicity testing for pharmaceuticals is considered necessary are the scope of this guidance: I) Identification of a standard set of tests to be conducted for registration. (II) The extent of confirmatory experimentation in *in vitro* genotoxicity tests in the standard battery. Further issues that were considered necessary for harmonisation can be found in the ICH guidance *Notes for Guidance on Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests.* **The two ICH guidances on genotoxicity complement each other and therefore should be used together as ICH guidance principles for testing of a pharmaceutical for potential genotoxicity .**

2. GENERAL PURPOSE OF GENOTOXICITY TESTING

Genotoxicity tests can be defined as *in vitro* and *in vivo* tests designed to detect compounds which induce genetic damage directly or indirectly by various mechanisms. These tests should enable a hazard identification with respect to damage to DNA and its fixation. Fixation of damage to DNA in the form of gene mutations, larger scale chromosomal damage, recombination and numerical chromosome changes is generally considered to be essential for heritable effects and in the multi-step process of malignancy, a complex process in which genetic changes may play only a part. Compounds which are positive in tests that detect such kinds of damage have the potential to be human carcinogens and/or mutagens, i.e. may induce cancer and/or heritable defects. Because the relationship between exposure to particular chemicals and carcinogenesis is established for man, whilst a similar relationship has been difficult to prove for heritable diseases, genotoxicity tests have been used mainly for the prediction of carcinogenicity. Nevertheless, because germ line mutations are clearly associated with human disease, the suspicion that a compound may induce heritable effects is considered to be just as serious as the suspicion that a compound may induce cancer. In addition, the outcome of such tests may be valuable for the interpretation of carcinogenicity studies.

3. THE STANDARD TEST BATTERY FOR GENOTOXICITY

Registration of pharmaceuticals requires a comprehensive assessment of their genotoxic potential. It is clear that no single test is capable of detecting all relevant genotoxic agents. Therefore, the usual approach should be to carry out a battery of *in vitro* and *in vivo* tests for genotoxicity. Such tests are complementary rather than representing different levels of hierarchy.

The general features of a standard test battery can be outlined as follows:

i) It is appropriate to assess genotoxicity in a bacterial reverse mutation test. This test has been shown to detect relevant genetic changes and the majority of genotoxic rodent carcinogens.

ii) DNA damage considered to be relevant for mammalian cells and not adequately measured in bacteria should be evaluated in mammalian cells. Several mammalian cell systems are in use: systems that detect gross chromosomal damage *(in vitro* tests for structural and numerical chromosomal aberrations), systems that detect primarily gene mutations *(see Note 1*), and a system that detects gene mutations and clastogenic effects (mouse lymphoma tk assay) (*see Note 2).* The information given in *Notes 3* and *4* demonstrate that with appropriate test protocols *(see Section 5)* the various *in vitro* tests for chromosomal damage and the mouse lymphoma tk assay yield results with a high level of congruence for compounds that are regarded as genotoxic but yield negative results in the bacterial reverse mutation assay. Therefore, these systems are currently considered interchangeable when used together with other genotoxicity tests in a standard battery for genotoxicity testing of pharmaceuticals, if these test protocols are used.

iii) An *in vivo* test for genetic damage should usually be a part of the test battery to provide a test model in which additional relevant factors (absorption, distribution metabolism, excretion) that may influence the genotoxic activity of a compound are included. As a result, *in vivo* tests permit the detection of some additional genotoxic agents *(see Note 5).* An *in vivo* test for chromosomal damage in rodent hematopoietic cells fulfills this need. This *in vivo* test for chromosomal damage in rodents could be either an analysis of chromosomal aberrations in bone marrow cells or an analysis of micronuclei in bone marrow or peripheral blood erythrocytes.

The following standard test battery is recommended based upon the considerations mentioned above:

i)	A test for gene mutation in bacteria
ii)	An *in vitro* test with cytogenetic evaluation of chromosomal damage with mammalian cells ***or*** an *in vitro* mouse lymphoma tk assay.
iii)	An *in vivo* test for chromosomal damage using rodent hematopoietic cells.

For compounds giving negative results, the completion of this 3-test battery, performed and evaluated in accordance with current recommendations, will usually provide a sufficient level of safety to demonstrate the absence of genotoxic activity (*see Note 6).* Compounds giving positive results in the standard test battery may, depending on their therapeutic use, need to be tested more extensively (see ICH *Guidance on Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals).*

The suggested standard set of tests does not imply that other genotoxicity tests are generally considered as inadequate or inappropriate (e.g. tests for measurement of DNA adducts, DNA strand breaks, DNA repair or recombination). Such tests serve as options in addition to the standard battery for further investigation of genotoxicity test results obtained in the standard battery. Furthermore, molecular techniques to study mechanisms of genotoxicity in the standard battery systems may be useful for risk assessment. Only under extreme conditions in which one or more tests comprising the standard battery cannot be employed for technical reasons, alternative validated tests can serve as substitutes. For this to occur, sufficient scientific justification should be provided to support the argument that a given standard battery test is not appropriate.

The standard battery does not include an independent test designed specifically to test for aneuploidy. However, information on this type of damage may be derived from the tests for chromosomal damage *in vitro* and *in vivo*. Elements of the standard protocols that provide such Information are elevations in the mitotic index, polyploidy induction and micronucleus evaluation. There is also limited experimental evidence that aneuploidy inducers can be detected in the mouse lymphoma tk assay (see *Note 4)*. In such cases, further testing may be needed.

4. MODIFICATIONS OF THE 3-TEST BATTERY

The following sections give situations where the standard 3-test battery may need modification.

4.1 Limitations to the use of bacterial test organisms

There are circumstances where the performance of the bacterial reverse mutation test does not provide appropriate or sufficient information for the assessment of genotoxicity. This may be the case for compounds that are excessively toxic to bacteria (e.g. some antibiotics) and compounds thought or known to interfere with the mammalian cell replication system (e.g. topoisomerase inhibitors, nucleoside analogues, or inhibitors of DNA metabolism). For these cases, usually two *in vitro* mammalian cell tests should be performed using two different cell types and of two different endpoints [gene mutation *(see Note 1)* and chromosomal damage]. Nevertheless, it is still important to perform the bacterial reverse mutation test *(see Note 7);* either a full test or a limited (range-finding) test *(see Section 5)* may be appropriate.

4.2 Compounds bearing structural alerts for genotoxic activity

Structurally alerting compounds *(see Note 8)* are usually detectable in the standard 3-test battery. However, compounds bearing structural alerts that have given negative results in the standard 3-test battery may necessitate limited additional testing. The choice of

additional test(s) or protocol modification(s) depend on the chemical nature, the known reactivity and metabolism data on the structurally alerting compound under question (*see Note 9* and ICH *Guidance on Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals).*

4.3 Limitations to the use of standard *in vivo* tests

There are compounds for which standard *in vivo* tests do not provide additional useful information. This includes compounds for which data from studies on toxicokinetics or pharmacokinetics indicate that they are not systemically absorbed and therefore are not available for the target tissues in standard *in vivo* genotoxicity tests. Examples of such compounds are some radioimaging agents, aluminum based antacids, and some dermally applied pharmaceuticals. In cases where a modification of the route of administration does not provide sufficient target tissue exposure, it may be appropriate to base the evaluation only on *in vitro* testing.

4.4 Additional genotoxicity testing in relation to the carcinogenicity bioassay

4.4.1 Evidence for tumor response

Additional genotoxicity testing in appropriate models may be conducted for compounds that were negative in the standard 3-test battery but which have shown effects in carcinogenicity bioassay(s) with no clear evidence for a non-genotoxic mechanism. To help understand the mechanism of action, additional testing can include modified conditions for metabolic activation in *in vitro* tests or can include *in* vivo tests measuring genetic damage in target organs of tumour induction (e.g. liver UDS test, ^{32}P-postlabelling, mutation induction in transgenes, molecular characterisation of genetic changes in tumor-related genes).

4.4.2 Structurally unique chemical classes

On rare occasions, a completely novel compound in a unique structural chemical class will be introduced as a pharmaceutical. When such a compound will not be tested in chronic rodent carcinogenicity bioassays, further genotoxicity evaluation may be invoked.

5. STANDARD PROCEDURES FOR *IN VITRO* TESTS

Reproducibility of experimental results is an essential component of research involving novel methods or unexpected findings; however, the routine testing of chemicals with standard, widely used genotoxicity tests need not always be completely replicated. These tests are sufficiently well characterized and have sufficient internal controls that repetition can usually be avoided if

protocols with built-in confirmatory elements, such as those outlined below, are used. For both bacterial and mammalian cell gene mutation tests, the results of a range-finding test can be used to guide the selection of concentrations to be used in the definitive mutagenicity test. By these means, a range-finding test may supply sufficient data to provide reassurance that the reported result is the correct one. In bacterial mutagenicity tests, preliminary range-finding tests performed on all bacterial strains, with and without metabolic activation, with appropriate positive and negative controls, and with quantification of mutants, may be considered a sufficient replication of a subsequent complete test. Similarly, a range-finding test may also be a satisfactory substitute for a complete repeat of a test in gene mutation tests with mammalian cells other than the mouse lymphoma tk assay (see below) if the range-finding test is performed with and without metabolic activation, with appropriate positive and negative controls, and with quantification of mutants (*see Note 10*).

For the cytogenetic evaluation of chromosomal damage *in vitro*, the test protocol includes the conduct of tests with and without metabolic activation, with appropriate positive and negative controls, where the exposure to the test articles is 3 to 6 hours and a sampling time of approximately 1.5 normal cell cycles from the beginning of the treatment. A continuous treatment without metabolic activation up to the sampling time of approximately 1.5 normal cell cycles is needed in case of a negative result for the short treatment period without metabolic activation. Certain chemicals may be more readily detected by longer treatment or delayed sampling times, e.g. some nucleoside analogues or some nitrosamines. Negative results in the presence of a metabolic activation system may need confirmation on a case by case basis (*see Note 11*). In any case information on the ploidy status should be obtained by recording the incidence of polyploid cells as a percentage of the number of metaphase cells. An elevated mitotic index or an increased incidence of polyploid cells may give an indication of the potential of a compound to induce aneuploidy. In such cases, further testing may be needed.

For the mouse lymphoma tk assay, the test protocol includes the conduct of tests with and without metabolic activation, with appropriate positive and negative controls, where the exposure to the test articles is 3 to 4 hours. A continuous treatment without metabolic activation for approximately 24 hours is needed in case of a negative result for the short treatment without metabolic activation *(see Note 4)*. Negative results in the presence of a metabolic activation system may need confirmation on a case by case basis (*see Note 11*). In any case, an acceptable mouse lymphoma tk assay includes (i) the incorporation of positive controls which induces mainly small colonies, (ii) colony sizing for positive controls, solvent controls and at least one positive test compound dose (should any exist), including the culture that gave the greatest mutant frequency.

Following such testing, further confirmatory testing in the class of clearly negative or positive test results is not usually needed.

Ideally it should be possible to declare test results as clearly negative or clearly positive. However, test results sometimes do not fit the predetermined criteria for a positive or negative call and therefore are declared "equivocal". The application of statistical methods aids in data interpretation is of critical importance. Nonetheless, further testing is usually indicated for equivocal results.

6. NOTES

(1) Test approaches currently accepted for the assessment of mammalian cell gene mutation involve the *tk* locus using mouse lymphoma L5178Y cells or human lymphoblastoid TK6 cells, the *hprt* locus using CHO cells, V79 cells, or L5178Y cells, or the *gpt* locus using AS52 cells.

(2) The molecular dissection of mutants induced at the tk locus shows a broad range of genetic events including point mutations, deletions, translocations, recombinations etc. Small colony mutants have been shown to predominantly lack the *tkb* allele as a consequence of structural or numerical alterations or recombinational events. There is some evidence that other loci, such as *hprt* or *gpt* are also sensitive to large deletion events. However, due to the X-chromosomal origin of the *hprt* gene which is probably flanked by essential genes, large scale deletion events or numerical alterations often do not give rise to mutant colonies, thus limiting the sensitivity of this genetic locus relative to the *tk* locus for the detection of a wide range of genetic changes.

(3) With respect to the cytogenetic evaluation of chromosomal damage, it is not uncommon for the systems currently in use, i.e. several systems with permanent mammalian cells in culture and human lymphocytes either isolated or in whole blood, to give different results for the same test compound. However, there is evidence that some of the differences observed have been due to protocol differences. This may be minimized by using the procedures described in *Section 5.*

For the great majority of presumptive genotoxic compounds that were negative in a bacterial reverse mutation assay, the data on chromosomal damage *in vitro* and mouse lymphoma *tk* results are in agreement. Several reliable studies indicate that the mouse lymphoma *tk* assay is able to detect compounds that induce structural and numerical chromosomal damage. For safety testing of pharmaceuticals, the mouse lymphoma *tk* assay, is considered an acceptable alternative to the direct analysis of chromosomal damage *in vitro.* Although colony sizing is an essential element of the mouse lymphoma *tk* assay test protocol, it gives only limited information on the type of damage induced in mutant colonies. Further mechanistic investigations may be used to assess the nature of cytogenetic changes induced b clastogens and aneuploidy inducers in the mouse lymphoma tk assay. Such information could be provided by studies to demonstrate the loss of the *tk* gene or the loss of the chromosome carrying the *tk* gene.

(4) The detection of a number of different nucleoside analogues and base analogues is enhanced for the mouse lymphoma tk assay when the treatment protocol for both agar and microtitre methods include a 24 hour treatment regimen in the absence of an exogenous metabolic activation system. Similarly, the detection of aneuploidy inducers is enhanced if a 24 hour treatment regimen is used with the microtitre method. Currently, there is no evidence to support this conclusion for the soft agar method. The specificity of the test protocol, i.e. to obtain correct test results for presumptive non-genotoxic compounds, does not change significantly using a 24 hour treatment in the microtitre method. For the soft agar method there appears to be a reduction in specificity under the same treatment regimen. Based on this information, the microtitre method is recommended for use in the standard battery.

(5) There are a small but significant number of genotoxic carcinogens that are reliably detected by the bone marrow tests for chromosomal damage that have yielded negative/week/conflicting results in the pairs of *in vitro* tests outlined in the standard battery options e.g. bacterial reverse mutation plus one of a selection of possible tests with cytogenetic evaluation of chromosomal damage or bacterial mutation plus the mouse lymphoma tk assay. Carcinogens such as procarbazine, hydroquinone, urethane and benzene fall into this category.

(6) The continuing evolution of short-term tests and test methodologies will afford new, more sensitive, more practical, more expeditious, and more economical techniques for detection of genotoxic compounds. Some of these may ultimately replace the genotoxicity tests used for regulatory purposes. Among the more promising tests, the *in vitro* micronucleus test appears to offer potential for screening purposes.

(7) Some antibacterial agents, albeit highly toxic to the tester strains, are detected as genotoxic at very low, sub-lethal concentrations in the bacterial reverse mutation test (e.g. nitrofuran antibiotics).

(8) Certain structurally alerting molecular entities are recognized as being causally related to the carcinogenic and /or mutagenic potential of chemicals. Examples of structural alerts include alkylating electrophilic centers, unstable epoxides, aromatic amines, azo-structures, N-nitroso-groups, aromatic nitro-groups.

(9) For some classes of compounds with specific structural alerts, it is established that specific protocol modifications/additional tests are necessary for optimum detection of genotoxicity (e.g. molecules containing an azo-group, glycosides, compounds such as nitroimidazoles requiring nitroreduction for activation, compounds such as phenacetin requiring another rodent S9 for metabolic activation). The additional testing needed when the chosen 3-test battery yields negative results for a structurally alerting test compound could consist of such modifications.

(10) The dose range-finding study should (i) give information on the shape of the toxicity dose-response curve if the test compound exhibits toxicity, (ii) include highly toxic concentrations, (iii) include quantification of mutants in the cytotoxic range. If a compound were not toxic, then mutants should nevertheless be quantified.

(11) A repetition of this using the identical source and concentration of the metabolic activation system is usually not necessary. A modification of the metabolic activation system may be indicated for certain chemical classes where knowledge is available on specific requirements of metabolism. This would usually invoke the use of an external metabolising system which is known to be competent for the metabolism/activation of the class of compound under test.

7. GLOSSARY

cytogenetic evaluation: chromosome structure analysis in mitosis or meiosis by light microscopy

DNA adduct: (covalent) binding of chemicals to DNA

DNA repair: reconstitution of damage DNA sequence

DNA strand breaks: single or double strand scissions in the DNA

numerical chromosome changes: chromosome numbers different from the original haploid or diploid set of chromosomes; for cell lines, chromosome numbers different from the modal chromosome set

recombination: breakage and balanced or unbalanced rejoining of DNA

transgene: an exogenous or foreign gene inserted into the host genome, either into somatic cells or germ lline cells

Santé Canada Health Canada

LIGNE DIRECTRICE À L'INTENTION DE L' INDUSTRIE

Génotoxicité: Batterie d'épreuves normalisées pour l'évaluation de la génotoxicité des produits pharmaceutiques

ICH thème S2B

Publication autorisée par le ministre de la Santé

Date d'approbation par le PPT	1999/12/16
Date d'entré en vigueur par le PPT	2000/03/24

Programme des produits thérapeutiques

Canada

Notre Mission est d'aider les Canadiens et les Canadiennes à maintenir et à améliorer leur état de santé.

Santé Canada

Notre Mission: Faire en sorte que les médicaments, les instruments médicaux et les autres produits thérapeutiques disponibles au Canada soient sûrs, efficaces et de grande qualité et que les stupéfiants et drogues d'usage restreint ne fassent l'objet d'aucun abus et ne soient pas détournés de leurs usages légitimes.

Programme des produits thérapeutiques

LE SITE WEB DU PROGRAMME DES PRODUITS THÉRAPEUTIQUES (Web-PT)

LAISSEZ VOTRE ORDINATEUR FAIRE LES RECHERCHES!

...Vous voulez savoir comment commercialiser un nouveau médicament?

...Vous souhaitez obtenir des renseignements au sujet du processus de réglementation des médicaments?

...Vous voulez connaître quels sont les médicaments les plus récemment autorisés au Canada?

...Vous souhaitez avoir un accès direct à nos formulaires et à nos politiques?

...Vous voulez connaître sont les contraintes en matière d' étiquetage des médicaments?

Vous pouvez obtenir ces renseignements et plusieurs autres en consultant

le site web du programme des produits thérapeutiques
à
www.hc-sc.gc.ca/hpb-dgps/therapeut

© Ministre, Travaux publics et services gouvernementaux Canada 2000

Disponible au Canada par l'entremise de
Santé Canada - Publications
Edifice Brooke Claxton, L. A. #0913A
Pré Tunney
OTTAWA (Ontario)
K1A 0K9

téléphone : (613) 954-5995
télécopieur : (613) 941-5366

also available in English under the following Title: *Genotoxicity: A Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals*

N° de catalogue H42-2-67/16-1999F
ISBN 0-662-84257-X

AVANT-PROPOS

La présente ligne directrice a été élaborée par un groupe d'experts de l'ICH et a fait l'objet de consultations, menées par les organismes de réglementation, conformément au processus de l'ICH. Le Comité directeur de l'ICH en a approuvé la version finale et en a recommandé l'adoption par les organismes de réglementation de l'Union européenne, du Japon et des États-Unis.

En adoptant cette ligne directrice de l'ICH, le Programme des produits thérapeutiques (PPT) fait siens les principes et les pratiques qui y sont énoncés. Ce document doit être lu en parallèle avec la lettre d'accompagnement et les sections pertinentes des autres lignes directrices applicables du Programme.

Les lignes directrices sont des documents destinés à guider l'industrie et les professionnels de la santé sur la **façon** de se conformer aux politiques du PPT et aux lois et règlements qui régissent leurs activités. Elles servent également de guide au personnel du PPT lors de l'évaluation et de la vérification de la conformité et permettent ainsi d'appliquer le mandat du Programme d'une façon équitable, uniforme et efficace.

Les lignes directrices sont des outils administratifs n'ayant pas de force de loi, ce qui permet une certaine souplesse d'approche. Les principes et les pratiques énoncés dans le présent document **pourraient être** remplacés par d'autres approches, à condition que celles-ci s'appuient sur une justification scientifique adéquate. Ces autres approches devraient être examinées préalablement en consultation avec le Programme pour s'assurer qu'elles respectent les exigences des lois et des règlements applicables.

Corollairement à ce qui précède, il importe également de mentionner que le Programme se réserve le droit de demander des renseignements ou du matériel supplémentaire, ou de définir des conditions dont il n'est pas explicitement question dans la ligne directrice, et ce, afin d'être en mesure d'évaluer adéquatement l'innocuité, l'efficacité ou la qualité d'un produit thérapeutique donné. Le PPT s'engage à justifier de telles demandes et à documenter clairement ses décisions.

TABLE DES MATIÈRES

1. INTRODUCTION 1

2. BUT GÉNÉRAL DE L'ÉVALUATION DE LA GÉNOTOXICITÉ 1

3. BATTERIE D'ÉPREUVES NORMALISÉES POUR L'ÉVALUATION DE LA GÉNOTOXICITÉ 1

4. MODIFICATION DE LA BATTERIE DE TROIS ÉPREUVES 3
   - 4.1 Limites de l'utilisation des bactéries 3
   - 4.2 Composés à structure indicatrice d'activité génotoxique 4
   - 4.3 Limites des épreuves *in vivo* normalisées 4
   - 4.4 Épreuves additionnelles motivées par les résultats de l'épreuve de cancérogénicité 4
     - 4.4.1 Réponse tumorigène 4
     - 4.4.2 Composés chimiques à structure exceptionnelle 5

5. ÉPREUVES *IN VITRO* NORMALISÉES 5

6. REMARQUES 6

7. GLOSSAIRE 9

1. INTRODUCTION

Les présentes lignes directrices sont destinées à harmoniser l'évaluation de la génotoxicité des produits pharmaceutiques, considérée comme une nécessité à deux égards : I) l'instauration d'une batterie d'épreuves normalisées pour l'homologation et II) le degré de confirmation nécessaire dans les épreuves de génotoxicité *in vitro* normalisées. Les autres aspects qu'il a été jugé nécessaire d'harmoniser sont traités dans les lignes directrices de l'ICH intitulée *Essais réglementaires de génotoxicité des produits pharmaceutiques : aspects particuliers*. **Comme ces deux lignes directrices de l'ICH se complètent, l'évaluation du pouvoir génotoxique des produits pharmaceutiques doit se faire suivant les principes qui y sont énoncés.**

2. BUT GÉNÉRAL DE L'ÉVALUATION DE LA GÉNOTOXICITÉ

On peut définir l'évaluation de la génotoxicité comme un ensemble d'épreuves *in vitro* et *in vivo* par lesquelles il est possible de détecter les composés qui induisent des lésions génétiques directement ou indirectement, c'est-à-dire par l'intermédiaire de divers mécanismes. Ces épreuves doivent permettre de déterminer quel danger posent les lésions causées à l'ADN et dans quelle mesure elles sont fixées, c'est-à-dire permanentes. En général, il est indispensable que la lésion ait la permanence d'une mutation génique, d'une lésion chromosomique étendue, d'une recombinaison ou d'un changement du nombre chromosomique pour que ses effets soient héréditaires ou que survienne la cancérisation, processus complexe aux étapes multiples dans lequel les changements génétiques ne jouent peut-être qu'un rôle partiel. Les composés qui déterminent des réactions positives dans les épreuves permettant de détecter ce genre de lésions peuvent avoir des effets cancérogènes et (ou) mutagènes chez l'humain, c'est-à-dire qu'ils peuvent causer le cancer et (ou) des anomalies héréditaires. On a établi l'existence d'un lien entre l'exposition à certains produits chimiques et la cancérogenèse chez l'humain et, bien que l'existence d'une telle relation soit moins facile à prouver dans le cas des maladies héréditaires, les épreuves de génotoxicité sont utilisées principalement pour prévoir la cancérogénicité. Quoi qu'il en soit, les mutations touchant la lignée germinale sont clairement associées à des maladies chez l'humain, de sorte que si l'on soupçonne un produit d'avoir un effet héréditaire, la question est aussi sérieuse que si l'on soupçonne des propriétés cancérogènes. En outre, les résultats des épreuves de génotoxicité peuvent être utiles pour l'interprétation des études de cancérogénicité.

3. BATTERIE D'ÉPREUVES NORMALISÉES POUR L'ÉVALUATION DE LA GÉNOTOXICITÉ

L'homologation d'un produit pharmaceutique nécessite une évaluation approfondie de son potentiel génotoxique. À l'évidence, aucune épreuve ne permet à elle seule de détecter tous les agents génotoxiques. Il devrait donc être de règle de réaliser une batterie d'épreuves de génotoxicité *in vitro* et *in vivo*. Il faut voir ces épreuves comme des éléments complémentaires, non comme les différents niveaux de l'évaluation.

Une batterie d'épreuves normalisées devrait présenter les caractéristiques générales suivantes :

i) L'épreuve de mutation inverse bactérienne est indiquée pour l'évaluation de la génotoxicité. On a montré qu'elle permet de mettre en évidence des changements génétiques présentant de l'intérêt et de détecter la majorité des agents qui sont cancérogènes pour les rongeurs et qui possèdent des propriétés génotoxiques.

ii) Les lésions susceptibles de toucher l'ADN mammalien et qui ne peuvent être mesurées de façon satisfaisante chez des bactéries doivent être évaluées dans des cellules mammaliennes. Divers systèmes de cellules mammaliennes peuvent être utilisés à cette fin : certains servent à détecter les lésions chromosomiques macroscopiques (épreuves *in vitro* mettant en évidence les anomalies de la structure chromosomique et du nombre chromosomique), d'autres sont surtout utilisés pour rechercher les mutations géniques *(voir la Remarque 1)*, et un dernier permet de mettre en évidence les mutations géniques et les effets clastogènes (épreuve du lymphome murin à gène *tk*) (*voir la remarque 2).* Aux *remarques 3* et *4*, on explique que, si l'on utilise la méthode appropriée *(voir la remarque 5)*, les épreuves de détection *in vitro* des lésions chromosomiques et l'épreuve du lymphome murin à gène *tk* donnent des résultats qui présentent entre eux un grand degré de concordance pour les composés considérés comme génotoxiques mais qui donnent des résultats négatifs dans l'épreuve de mutation inverse bactérienne. Par conséquent, ces épreuves sont maintenant considérées comme interchangeables lorsqu'elles sont combinées à d'autres dans une batterie normalisée d'évaluation génotoxique des produits pharmaceutiques, à la condition qu'elles soient réalisées suivant les méthodes appropriées.

iii) En général, la batterie doit comprendre une épreuve de détection *in vivo* des lésions génétiques qui servira de modèle : on y fait intervenir des facteurs additionnels (absorption, distribution, métabolisme, excrétion) susceptibles d'influer sur l'activité génotoxique du composé évalué. Les épreuves *in vivo*

permettent de détecter un certain nombre d'autres agents génotoxiques *(voir la remarque 5)*. Une épreuve *in vivo* révélant les lésions chromosomiques dans les cellules hématopoïétiques de rongeur peut faire l'affaire ici; cette épreuve peut porter sur les aberrations chromosomiques touchant les cellules de la moelle osseuse, sur les micronoyaux de la moelle osseuse ou sur les érythrocytes circulants.

À la lumière des considérations énoncées ci-dessus, la batterie d'épreuves normalisées décrite ci-après est recommandée :

i)	Une épreuve bactérienne mettant en évidence les mutations géniques
ii)	Une épreuve *in vitro* sur cellules de mamifères permettant l'évaluation cytogénétique des lésions chromosomiques ***ou*** une épreuve *in vitro* sur cellules de lymphome murin à gène *tk*
iii)	Une épreuve *in vivo* sur cellules hématopoïétiques de rongeurs mettant en évidence les lésions chromosomiques

Pour les composés donnant des résultats négatifs, ces trois épreuves, si elles sont réalisées et évaluées suivant les recommandations, permettent habituellement de démontrer de façon suffisamment certaine l'absence d'activité génotoxique (*voir la remarque 6)*. Les composés donnant des résultats positifs peuvent, selon l'usage thérapeutique auquel ils sont destinés, nécessiter une évaluation plus poussée (voir les lignes directrices de l'ICH intitulée *Essais réglementaires de génotoxicité des produits pharmaceutiques : aspects particuliers)*.

Il ne faudrait pas conclure, parce que certaines épreuves normalisées sont recommandées, que les autres méthodes d'évaluation de la génotoxicité sont généralement insuffisantes ou inacceptables (p. ex. les épreuves portant sur les adduits, les cassures, les produits de réparation d'ADN ou les recombinaisons d'ADN) : ce sont des options auxquelles on peut recourir pour approfondir les résultats obtenus au moyen de la batterie. Par ailleurs, les techniques moléculaires utilisées pour étudier les mécanismes de la génotoxicité dans les épreuves de la batterie peuvent être utiles dans l'évaluation des risques. En fait, ce n'est que dans le cas vraiment exceptionnel où des difficultés techniques rendent impossible la réalisation d'une ou de plusieurs des épreuves de la batterie qu'on peut les remplacer par d'autres méthodes validées. Il faut présenter une justification scientifique suffisante lorsqu'on avance qu'une des épreuves de la batterie n'est pas indiquée.

La batterie ne comprend pas d'épreuve indépendante conçue expressément pour mettre l'aneuploïdie en évidence, mais les épreuves *in vitro* et *in vivo* sur les lésions chromosomiques comportent des éléments qui peuvent nous apporter des données : il s'agit de l'augmentation de l'indice mitotique, de l'induction de la polyploïdie et de l'analyse des micronoyaux. Par ailleurs, un nombre limité de données expérimentales indiquent qu'il est possible de détecter les inducteurs d'aneuploïdie avec l'épreuve du lymphome murin à gène *tk* (*voir la remarque 4)*. Lorsque de tels phénomènes sont mis en évidence, il peut être nécessaire d'approfondir l'étude du produit.

4. MODIFICATION DE LA BATTERIE DE TROIS ÉPREUVES

Ci-après sont décrites des situations où la batterie d'épreuves normalisées peut nécessiter des modifications.

4.1 Limites de l'utilisation des bactéries

Dans certaines circonstances, l'épreuve de mutation inverse bactérienne n'apporte pas une information suffisante ou appropriée pour évaluer la génotoxicité. Ce peut être le cas lorsque le composé évalué est très toxique pour les bactéries (p. ex. certains antibiotiques) ou qu'il a un effet nuisible, présumé ou avéré, sur le système de réplication cellulaire mammalien (p. ex. les inhibiteurs de la topoisomérase, les analogues de nucléosides ou les inhibiteurs du métabolisme de l'ADN). Habituellement dans ce genre de circonstances, il faut faire deux épreuves *in vitro* sur cellules de mammifères en utilisant deux types de cellules différents et en étudiant deux effets différents [mutation génique *(voir la remarque 1)* et lésion chromosomique]. Quoi qu'il en soit, l'épreuve de mutation inverse bactérienne (*voir la remarque 7)* demeure importante, qu'elle soit complète ou limitée (délimitation d'une plage de valeurs) *(voir la partie 5)*.

4.2 Composés à structure indicatrice d'activité génotoxique

Habituellement, la batterie d'épreuves normalisées permet de mettre en évidence les composés dont la structure indique des propriétés génotoxiques *(voir la remarque 8)*. Il peut toutefois se révéler nécessaire de pousser un peu plus l'analyse des composés à structure indicatrice qui ont donné des résultats négatifs dans les épreuves normalisées de la batterie. On choisit les épreuves additionnelles à réaliser à cette fin et l'on décide des modifications à apporter aux épreuves normalisées selon la nature du composé et ce qu'on sait sur sa réactivité et son métabolisme (*voir la remarque 9* et les lignes directrices de l'ICH intitulée *Essais réglementaires de génotoxicité des produits pharmaceutiques : aspects particuliers*).

4.3 Limites des épreuves *in vivo* normalisées

Avec certains composés, les épreuves *in vivo* normalisées n'apportent aucune information supplémentaire qui soit utile. Ce sont notamment les composés pour lesquels les études de toxicocinétique ou de pharmacocinétique révèlent qu'ils ne sont pas absorbés dans tout l'organisme, de sorte qu'ils n'atteignent pas les tissus cibles dans les épreuves de génotoxicité *in vivo* de la batterie normalisée. C'est le cas, par exemple, de certains agents de radioimagerie, des antiacides à base d'aluminium et de certains produits pharmaceutiques administrés par voie dermique. Lorsque le tissu cible n'est pas suffisamment exposé, même si la voie d'administration du produit a été modifiée, il peut être indiqué de ne fonder l'évaluation que sur des épreuves *in vitro*.

4.4 Épreuves additionnelles motivées par les résultats de l'épreuve de cancérogénicité

4.4.1 Réponse tumorigène

On peut faire des épreuves de génotoxicité additionnelles avec des modèles appropriés lorsque le composé donne des résultats négatifs dans les épreuves de la batterie, mais qu'on a observé des effets dans une ou plusieurs épreuves de cancérogénicité sans pouvoir mettre clairement en évidence un mécanisme non génotoxique. Afin de comprendre le mécanisme d'action, on peut ajouter des épreuves *in vitro* modifiées par un facteur d'activation métabolique ou des épreuves *in vivo* permettant de mesurer les lésions génétiques dans les tissus cibles des agents tumorigènes (p. ex. synthèse d'ADN atypique (UDS) dans les tissus hépatiques, postmarquage au ^{32}P, induction de mutations dans des transgènes et caractérisation moléculaire des changements génétiques dans des gènes liés à des phénomènes tumoraux).

4.4.2 Composés chimiques à structure exceptionnelle

Il arrive parfois, quoique rarement, qu'un produit tout à fait nouveau, appartenant à une classe de composés à structure exceptionnelle, soit utilisé dans une application pharmaceutique. Pour ce genre de produits, lorsqu'il n'y a pas eu d'épreuves de cancérogénicité chronique chez des rongeurs, il peut être indiqué de pousser l'évaluation de la génotoxicité.

5. ÉPREUVES *IN VITRO* NORMALISÉES

La reproductibilité est essentielle dans les travaux de recherche qui font intervenir de nouvelles méthodes ou dont les résultats sont imprévisibles; toutefois, pour l'évaluation de routine réalisée au moyen d'épreuves de génotoxicité normalisées très courantes, il n'est pas toujours nécessaire de tout répéter complètement. En effet, comme ces épreuves sont bien caractérisées et comportent un nombre suffisant d'éléments de contrôle internes, on peut généralement se passer de les répéter si l'on suit des méthodes comportant des éléments confirmatoires comme celles décrites ci-dessous.

Pour les épreuves de mutation génique sur cellules bactériennes ou de mammifères, on peut choisir les concentrations à utiliser dans l'épreuve de mutagénicité finale d'après les résultats de l'épreuve préliminaire de délimitation de plages de concentrations. Ainsi, une épreuve destinée à délimiter une plage de valeurs peut apporter suffisamment de données pour qu'on puisse affirmer que le résultat obtenu est correct. Dans le cas de la mutagénicité sur cellules bactériennes, les épreuves préliminaires de délimitation de plages de valeurs, si elles sont effectuées chez toutes les souches bactériennes, avec et sans activation métabolique, et si elles comprennent des témoins positifs et des témoins négatifs adéquats ainsi qu'un dénombrement des mutants, peuvent être considérées comme une répétition suffisante pour les fins de l'épreuve finale subséquente. De même, l'épreuve préliminaire de délimitation de plages de valeurs effectuée avec et sans activation métabolique et comprenant des témoins positifs et des témoins négatifs adéquats ainsi qu'un dénombrement des mutants peut remplacer adéquatement la répétition complète d'une épreuve de mutation génique sur cellules de mammifères sauf dans le cas de l'épreuve sur cellules de lymphome murin (gène *tk*) (voir ci-après) (*voir la remarque 10*).

Pour l'évaluation cytogénétique des lésions chromosomiques *in vitro*, le protocole prévoit des épreuves avec et sans activation métabolique comprenant des témoins positifs et des témoins négatifs adéquats, une exposition de 3 à 6 heures et une période d'échantillonnage correspondant approximativement à une fois et demi le cycle cellulaire normal à compter du début du traitement. Si le traitement de courte durée sans activation métabolique donne un résultat négatif, il faut reprendre avec un traitement continu, sans activation métabolique, pendant une période atteignant à peu près une fois et demi le cycle cellulaire normal. Les propriétés de certains produits chimiques sont plus facilement révélées par un traitement de plus longue durée ou par des échantillonnages différés, comme c'est le cas, par exemple, de certains analogues de nucléosides et de certaines nitrosamines. Pour les épreuves avec activation métabolique qui donnent des résultats négatifs, on détermine dans chaque cas s'il y a lieu de faire une épreuve confirmatoire (*voir la remarque 11*). Quoi qu'il en soit, il convient de recueillir des données sur la ploïdie et, pour ce faire, de déterminer l'incidence des cellules polyploïdes, c'est-à-dire leur

proportion par rapport au nombre de cellules en métaphase. Un indice mitotique élevé ou une incidence accrue de cellules polyploïdes peut donner des indications sur l'aptitude du composé à induire l'aneuploïdie; dans de telles conditions, il peut être nécessaire de faire des analyses additionnelles.

Pour l'épreuve sur cellules de lymphome murin à gène *tk*, le protocole prévoit des épreuves avec et sans activation métabolique et avec témoins positifs et témoins négatifs adéquats ainsi qu'une exposition de 3 à 4 heures. Si le traitement de courte durée sans activation métabolique donne un résultat négatif, il faut reprendre avec un traitement continu sans activation métabolique d'environ 24 heures *(voir la remarque 4)*. Pour les épreuves avec activation métabolique qui donnent des résultats négatifs, on détermine dans chaque cas s'il y a lieu de faire une épreuve confirmatoire (*voir la remarque 11*). Quoi qu'il en soit, pour être acceptable, une épreuve sur
cellules de lymphome murin à gène *tk* doit comprendre : i) des témoins positifs qui produisent surtout des petites colonies, ii) une évaluation de la taille des colonies pour le repérage des témoins positifs, des témoins en solvant et au moins une dose de composé donnant des résultats positifs dans une épreuve (s'il y en a), y compris la culture dans laquelle on a mesuré la fréquence de mutants la plus élevée.

Après avoir réalisé ces épreuves, la confirmation n'est généralement pas nécessaire si les résultats sont nettement négatifs ou positifs.

Idéalement, il devrait être possible de fournir des résultats nettement positifs ou nettement négatifs. Toutefois, il arrive parfois que les résultats obtenus ne satisfassent pas aux critères prédéterminés définissant la désignation positive ou négative, si bien qu'ils sont dits « douteux ». Les analyses statistiques revêtent une importance capitale dans l'interprétation des données. Néanmoins, il est habituellement opportun de pousser l'évaluation lorsque les résultats sont douteux.

6. REMARQUES

1) Les épreuves actuellement acceptées pour l'évaluation des mutations géniques sur cellules de mammifères portent sur le locus *tk* des cellules L5178Y de lymphome murin ou des cellules lymphoblastoïdes TK6 d'humains, sur le locus *hprt* de cellules CHO, V79 ou L5178Y, ou sur le locus *gpt* de cellules AS52.

2) La dissection moléculaire des mutants du locus *tk* révèle toute une variété de phénomènes génétiques dont des mutations ponctuelles, des délétions, des translocations, des recombinaisons, etc. Il a été démontré que la plupart des bactéries mutantes formatrices de petites colonies sont dépourvues de l'allèle *tkb* à cause de modifications de la structure chromosomique, de changements du nombre chromosomique ou de phénomènes de

recombinaison. Certaines données indiquent que d'autres locus, comme *hprt* ou *gpt*, sont également susceptibles d'être le siège de délétions d'envergure. Toutefois, comme le gène *hprt* provient du chromosome X et qu'il est probablement flanqué de gènes essentiels, il arrive souvent que les délétions de grande envergure ou les changements du nombre chromosomique n'engendrent pas de colonies mutantes; ainsi, pour toute une variété de changements génétiques, le locus *hprt* est un moyen de détection moins sensible que le locus *tk*.

3) Dans l'évaluation cytogénétique des lésions chromosomiques, avec les systèmes actuellement en usage, c'est-à-dire divers systèmes de culture permanente de cellules de mammifères et de lymphocytes humains isolés ou conservés dans du sang entier, il n'est pas rare qu'on obtienne des résultats différents pour un même produit. On a toutefois des raisons de croire que certaines des disparités observées sont dues à des différences de méthode. On peut limiter ce facteur de divergence en utilisant les méthodes décrites dans la *partie 5*.

Pour la grande majorité des composés présumés génotoxiques qui donnent des résultats négatifs dans l'épreuve de mutation inverse, les données sur les lésions chromosomiques observées *in vitro* concordent avec les résultats de l'épreuve sur cellules de lymphome murin à gène *tk*. Plusieurs études fiables indiquent que l'épreuve sur cellules de lymphome murin à gène *tk* permet de trouver les composés qui causent des lésions à la structure chromosomique et des changements du nombre chromosomique. Pour l'évaluation de l'innocuité des produits pharmaceutiques, l'épreuve sur cellules de lymphome murin à gène *tk* est considérée comme un substitut acceptable de l'analyse directe des lésions chromosomiques *in vitro*. L'évaluation de la taille des colonies est un élément essentiel de l'épreuve sur cellules de lymphome murin à gène *tk*, mais elle n'apporte que des données limitées sur la nature des lésions déterminées dans les colonies mutantes. On peut faire d'autres analyses sur les mécanismes d'action pour connaître la nature des changements cytogénétiques provoqués par les agents clastogènes et les inducteurs d'aneuploïdie dans l'épreuve sur cellules de lymphome murin à gène *tk*. À cet égard, les travaux destinés à mettre en évidence la disparition du gène *tk* ou du chromosome portant le gène *tk* peuvent être éclairants.

4) Avec l'épreuve sur cellules de lymphome murin à gène *tk*, un certain nombre d'analogues de nucléosides et d'analogues de bases se détectent mieux et ce, tant avec le procédé en gélose qu'avec le microtitrage, lorsqu'on applique un régime de traitement de 24 heures sans système d'activation métabolique exogène. De même, la détection des inducteurs d'aneuploïdie est meilleure avec le procédé à microtitrage si l'on applique un régime de traitement de 24 heures. Actuellement, rien ne permet d'affirmer la même chose pour le procédé en gélose molle. Avec le microtitrage, le traitement de 24 heures ne modifie pas

dans une mesure significative la spécificité de l'épreuve, c'est-à-dire que celle-ci donnera des résultats exacts pour les composés présumés non génotoxiques; par contre, dans le cas du procédé à gélose molle, il semble que la spécificité de l'épreuve soit moindre lorsqu'on applique un régime de traitement de 24 heures. À la lumière de ces constatations, le microtitrage est recommandé pour la batterie d'épreuves normalisées.

5) Un nombre limité, mais non négligeable, de produits cancérogènes dont les propriétés génotoxiques sont toujours mises en évidence dans les épreuves sur moelle osseuse révélant les lésions chromosomiques ont donné des résultats négatifs, douteux ou contradictoires dans deux des épreuves *in vitro* de la batterie d'épreuves normalisées, soit, par exemple, la mutation inverse bactérienne combinée à l'une des épreuves possibles pour l'évaluation cytogénétique des lésions chromosomiques, ou la mutation bactérienne combinée à l'épreuve sur cellules de lymphome murin à gène *tk*. Des substances cancérogènes comme la procarbazine, l'hydroquinone, l'uréthane et le benzène appartiennent à ce groupe.

6) Comme les épreuves à court terme et la méthodologie évoluent sans cesse, on mettra au point de nouvelles techniques plus sensibles, plus pratiques, plus rapides et plus économiques pour détecter les produits génotoxiques. Certaines d'entre elles finiront peut-être par remplacer les épreuves de génotoxicité utilisées pour les vérifications exigées par la réglementation. Parmi les techniques les plus prometteuses, l'épreuve des micronoyaux *in vitro* semble avoir du potentiel comme procédé de sélection.

7) Avec l'épreuve de la mutation inverse bactérienne, on peut mettre en évidence les propriétés génotoxiques de certains agents antibactériens très toxiques pour les souches employées en utilisant des concentrations sublétales très faibles (p. ex. les nitrofurannes).

8) On a déterminé l'existence d'une relation causale entre certains groupements à structure indicatrice et le potentiel cancérogène et (ou) mutagène des produits chimiques dont ils font partie. Les noyaux électrophiles alkylants, les époxydes instables, les amines aromatiques, les groupements azo, les groupements N-nitroso et les groupements nitro aromatiques en sont des exemples.

9) Pour certaines classes de composés possédant une structure indicatrice déterminée, il a été établi qu'il faut apporter certaines modifications aux méthodes ou faire certaines épreuves supplémentaires pour que la mise en évidence des propriétés génotoxiques soit optimale (p.ex. les molécules renfermant un groupement azo, les glycosides, les composés dont l'activation nécessite une nitroréduction comme les nitroimidazoles, ainsi que les composés dont l'activation métabolique nécessite une autre fraction S9 de rongeur,

comme la phénacétine). Lorsque les trois épreuves normalisées retenues dans la batterie donnent des résultats négatifs pour un composé à structure indicatrice, les épreuves additionnelles peuvent comporter ce genre de modifications.

10) L'étude devant permettre de délimiter la plage de doses doit i) permettre d'établir la courbe dose-toxicité lorsque le composé évalué a des effets toxiques, ii) comprendre des concentrations très toxiques et iii) permettre de quantifier les mutants aux concentrations cytotoxiques. Si le composé n'est pas toxique, il faut quand même dénombrer les mutants.

11) Il n'est habituellement pas nécessaire de répéter l'épreuve avec le même système d'activation métabolique utilisé à la même concentration. Il peut être indiqué de modifier le système d'activation métabolique pour certaines classes de composés chimiques lorsqu'on connaît leurs exigences métaboliques particulières. En général, il faut alors utiliser un système métabolique externe apte à métaboliser et à activer les composés de la classe à laquelle appartient celui qui est évalué.

7. GLOSSAIRE

évaluation cytogénétique : étude au microscope optique de la structure chromosomique pendant la mitose ou la méiose

adduit d'ADN : résultat d'une liaison (covalente) entre des produits chimiques et de l'ADN

réparation de l'ADN : reconstitution d'une séquence d'ADN présentant une lésion

cassure d'ADN : rupture d'un ou de deux brins d'ADN

changement du nombre chromosomique : il y a changement du nombre chromosomique lorsque le nombre de chromosomes des cellules obtenues est différent de celui des cellules haploïdes ou diploïdes initiales; dans le cas de lignées cellulaires, il y a changement lorsque le nombre de chromosomes diffère du nombre chromosomique type

recombinaison : processus au cours duquel l'ADN est coupé puis lié à nouveau, de façon équilibrée ou non

transgène : gène exogène ou étranger inséré dans le génome de la cellule hôte somatique ou de germinale